



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : A61K 37/02 // (A61K 37/02, 37:66)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/21275 (43) Date de publication internationale: 29 septembre 1994 (29.09.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00307 (22) Date de dépôt international: 21 mars 1994 (21.03.94)  (30) Données relatives à la priorité: 93/03230 19 mars 1993 (19.03.93) FR 93/03787 31 mars 1993 (31.03.93) FR		(81) Etats désignés: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): VACSYN S.A. [FR/FR]; "Les Chevrons", 33, boulevard du Général-Martial-Valin, F-75015 Paris (FR).  (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHEDID, Louis [FR/FR]; 18, rue Gaston-de-Caillavet, F-75015 Paris (FR). BAHR, Georges [FR/FR]; Minerve 1, 14, rue Paul-Lafargue, F-92800 Puteaux (FR). LEFRANCIER, Pierre [FR/FR]; 46, allée de la Mare-l'Oiseau, Chevry 2, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).  (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).			
(54) Title: THERAPEUTICAL COMPOSITIONS FOR USE IN HUMANS, CHARACTERISED BY A COMBINATION OF A MURAMYL PEPTIDE AND A CYTOKINE  (54) Titre: COMPOSITIONS POUR L'APPLICATION EN THERAPEUTIQUE HUMAINE, CARACTERISEES PAR L'ASSOCIATION D'UN MURAMYL-PEPTIDE A UNE CYTOKINE			
(57) Abstract <p>A therapeutical composition for use in humans, comprising a combination of at least one natural or recombinant and preferably human cytokine with at least one muramyl peptide selected from those which, when administered <i>in vivo</i> together with an interferon, also induce an increased <i>in vivo</i> production of an interleukin-1 receptor antagonist IL-1 RA, but preferably do not induce any increase in TNF, IL-8 and IL-1 cytokines. Said composition is useful for antiviral and antitumoral therapies and/or for promoting restoration of the haematopoietic system, particularly in individuals with a weakened immune system.</p>			
(57) Abrégé <p>L'invention concerne une composition associant, aux fins de leur application en thérapeutique humaine, au moins une cytokine naturelle ou recombinante, de préférence humaine, avec au moins un muramyl-peptide choisi parmi ceux qui, lorsqu'ils sont administrés <i>in vivo</i> en association avec un interféron, induisent également la production accrue <i>in vivo</i> d'un antagoniste IL-1 RA du récepteur de l'interleukine I et, de préférence, n'induisent pas un accroissement des cytokines IL-1, TNF et IL-8. Elle est utilisable pour des thérapies antivirales, antitumorales et/ou pour favoriser une reconstitution du système hématopoïétique, notamment chez des personnes dont le système immunitaire est ou a été rendu déficient.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Malí	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

COMPOSITIONS POUR L'APPLICATION  
EN THERAPEUTIQUE HUMAINE, CARACTERISEES PAR  
L'ASSOCIATION D'UN MURAMYL-PEPTIDE A UNE CYTOKINE

Les interférons (plus particulièrement l'interféron  $\alpha$ ) sont sécrétés par les leucocytes. Ils sont à ce titre classés parmi les cytokines, médiateurs produits majoritairement par les cellules du système immunitaire. D'une façon générale, les cytokines peuvent être considérées comme des hormones caractéristiques du système immunitaire. La possibilité de produire des cytokines par recombinaison génétique a ouvert la voie à des études plus élaborées des comportements de certaines de ces cytokines, notamment d'interférons recombinants chez l'animal. Parmi les interférons, le plus étudié est l'interféron  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) qui se subdivise en IFN  $\alpha$  2a, IFN  $\alpha$  2b et IFN 2c.

En particulier, l'activité antivirale de certains interférons de souris, et même la potentialisation de cette activité chez la souris par certains dérivés de la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP) ou d'homologues de ceux-ci ont déjà été mises en évidence. En revanche, comme l'indique F. Dianzani dans son article intitulé "Interferon Treatments: how to use an Endogenous System as a Therapeutic Agent" (Traitements par l'interféron : Comment utiliser un système endogène en tant qu'agent thérapeutique) dans le "Journal of Interferon Research, Special Issue, May 1992, Mary Ann Liebert, Inc., Publishers, pp.109-118, les nombreux essais cliniques tentés chez l'homme avec des interférons ont été "plus que décevants". En effet, bien que les essais chez l'animal paraissaient ouvrir des potentialités thérapeutiques étendues, leurs effets secondaires mal contrôlés n'ont autorisé à ce jour leur utilisation que dans un nombre restreint d'indications thérapeutiques. Aussi a-t-il été proposé à ce jour de

n'utiliser l'IFN  $\alpha$  2a que dans un nombre réduit de "niches" comme l'indique aussi le "Scrip's Cytokines Report", PJB publications Ltd. 1993, à propos des difficultés rencontrées dans l'application en thérapeutique humaine des interférons :

- a) dans le traitement des cas d'hépatites B et C les plus graves. Les traitements consistent en administrations quotidiennes ou à raison de trois fois par semaine de 5 à 10 millions d'unités pendant 3 à 6 mois. Des résultats positifs sont observés dans 30 à 40% des cas ;
- b) dans le domaine du cancer, le traitement de la tricholeucémie chevelue (Hairy Cell Leukemia) et de la leucémie chronique myélogène, les applications envisagées sont le SIDA, le syndrome de Kaposi, le myélome multiple, le mélanome et certains types de carcinome.

La gravité de ces syndromes est telle qu'elle a aussi entraîné l'acceptation des graves effets secondaires accompagnant l'utilisation de l'IFN  $\alpha$  en thérapeutique humaine. Quatre vingt dix huit pour cent des patients ainsi traités souffrent en effet d'un syndrome grippal, souvent extrêmement sévère, accompagné de nausées, de vomissements, de troubles du système nerveux central et périphérique et de troubles cardiaques. Ces effets, sont attribués au moins en partie à l'induction par l'interféron de médiateurs pyrétiques qui pourraient être l'IL-1 et des prostaglandines dont la production serait activée par l'interféron. Il s'y ajoute des accès de fatigue, d'anorexie, de perte de poids, qui pourraient être liés au moins en partie à la production de TNF et/ou l'expression accrue de récepteurs de TNF également induits par les interférons. Toute procédure qui

optimiseraient les effets bénéfiques des interférons ou des cytokines thérapeutiquement utiles, tout en optimisant aussi les productions ou l'activité des cytokines ou d'autres médiateurs biologiques indésirables telles que IL-1, IL-8 et/ou TNF (abréviation de l'expression anglaise "Tumor Necrosis Factor" ou facteur de la nécrose tumorale), ne pourrait être que vouée à un échec certain.

Enfin les administrations d'interférons s'accompagnent souvent de fortes leucopénies et thrombopénies accompagnées d'un blocage de la maturation de précurseurs myéloïdes. Ces phénomènes entraînent la nécessité d'interrompre périodiquement les traitements à base d'interférons, pour chaque fois autoriser une régénération de la formule sanguine.

Autant d'inconvénients qui, jusqu'à ce jour, n'autorisent pas une exploration des possibilités réelles d'utilisation des interférons en thérapeutique humaine, hormis pour le traitement des quelques syndromes rappelés plus haut.

Des difficultés semblables sont rencontrées avec d'autres cytokines dont l'intérêt thérapeutique serait certain s'il était possible de remédier à ces difficultés. Il en serait ainsi par exemple de IL-2, IL-3, IL-6, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc... de TNF et de l'IL-1, dont les potentialités thérapeutiques ne peuvent être exploitées que très rarement.

On sait qu'il a été suggéré d'utiliser en particulier IL-3 et certains CSF pour accélérer la récupération hématopoïétique chez des patients frappés d'aplasie de moelle (qui se manifeste sous l'effet d'un facteur pathogène endogène et/ou iatrogène), en particulier à l'issue de traitements chimiothérapeutiques ou chez des patients ayant subi des transplantations de moelle. Mais l'utilisation de IL-3 en clinique humaine ou des CSFs les plus actifs (par exemple GM-CSF) se

heurte dans la pratique aux mêmes difficultés que l'interféron  $\alpha$ .

A ces inconvénients d'ordre thérapeutique, s'ajoutent les coûts extrêmes des traitements actuels à base de cytokines thérapeutiquement utiles. Les doses administrées, pour autant qu'on puisse en réguler l'effet in vivo, sont en effet considérables par rapport aux doses thérapeutiquement utiles, ce qui s'explique peut être par le fait que contrairement aux hormones endocrines, les cytokines n'agissent pas à distance mais seulement sur les cellules proches des cellules sécrétrices. En d'autres termes, toute cytokine administrée n'atteignant pas les cellules cibles peut être considérée comme "thérapeutiquement perdue".

L'invention a pour but de remédier au moins en grande partie à ces inconvénients et difficultés.

La possibilité de bénéficier des effets thérapeutiques de l'IFN  $\alpha$  ou de cytokines thérapeutiquement utiles autres que l'IFN  $\alpha$ , le cas échéant en doses plus réduites, sans provoquer d'effets secondaires insupportables serait un pas très important tant sur le plan thérapeutique que sur le plan économique. C'est un des objectifs que l'invention s'est fixé.

Plus précisément, l'invention a pour but d'accroître l'efficacité des thérapeutiques mettant en oeuvre un interféron ou, plus généralement, une cytokine ayant une valeur thérapeutique et, même, d'élargir les champs thérapeutiques de ces cytokines (dont naturellement l'interféron), tout en remédiant en grande partie aux inconvénients indiqués ci-dessus, plus particulièrement en rapport avec les interférons.

L'invention repose en grande partie sur la découverte que l'association de certains muramyl-peptides à une cytokine susceptible de présenter un

effet thérapeutique chez l'homme rendait désormais possible l'utilisation de certaines de ces cytokines en clinique humaine à des doses efficaces, ce qui ne pouvait auparavant être envisagé sérieusement, et dans le meilleur des cas (par exemple cas de l'interféron) ouvrant la voie à des gammes de traitement thérapeutique pour des indications cliniques en nombre et en efficacité considérablement plus importants. Il a en effet été constaté que ces muramyl-peptides permettaient également d'induire la synthèse in vivo d'autres cytokines qui n'apparaissent pas, tout au moins à des taux décelables, à la suite de l'administration seulement de l'un des deux éléments, interféron et muramyl-peptide, d'où par conséquent, un élargissement des spectres d'activité thérapeutique des cytokines et des muramyl-peptides. Parmi les cytokines induites, on mentionnera plus particulièrement, l'interleukine 6 (IL-6), de G-CSF et, d'un antagoniste (IL-1 RA) du récepteur de l'interleukine I. Qui plus est, les administrations associées de certains muramyl-peptides et de l'interféron  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ) permettent la production des effets recherchés en utilisant des doses sub-optimales de cytokine, notamment d'IFN  $\alpha$ , grâce à la potentialisation des effets bénéfiques de la cytokine, mais en l'absence d'induction des cytokines indésirables, notamment de IL-1, de TNF ou d'IL-8.

L'invention concerne donc plus particulièrement une association d'au moins une cytokine avec au moins un muramyl-peptide choisi parmi ceux qui, lorsqu'ils sont administrés in vivo en association avec un interféron, induisent également la production accrue in vivo d'un antagoniste IL-1 RA du récepteur de l'interleukine I et, de préférence, n'induisent pas un accroissement des cytokines IL-1, TNF et IL-8.

De préférence, on utilise plus particulièrement ceux des muramyl-peptides qui, répondant aux conditions mentionnées ci-dessus, induisent également, lorsqu'ils sont administrés avec un interféron, une synthèse accrue in vivo de IL-6 ou de G-CSF, ou de préférence les deux à la fois.

L'invention n'est pas limitée à l'association d'un interféron ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) à un tel muramyl-peptide. Les interférons peuvent également être remplacés par d'autres cytokines particulièrement par celles ci-dessus identifiées à titre d'exemple. En d'autres termes, l'invention découle de la capacité de certains muramyl-peptides, lorsqu'ils sont administrés en association avec une cytokine :

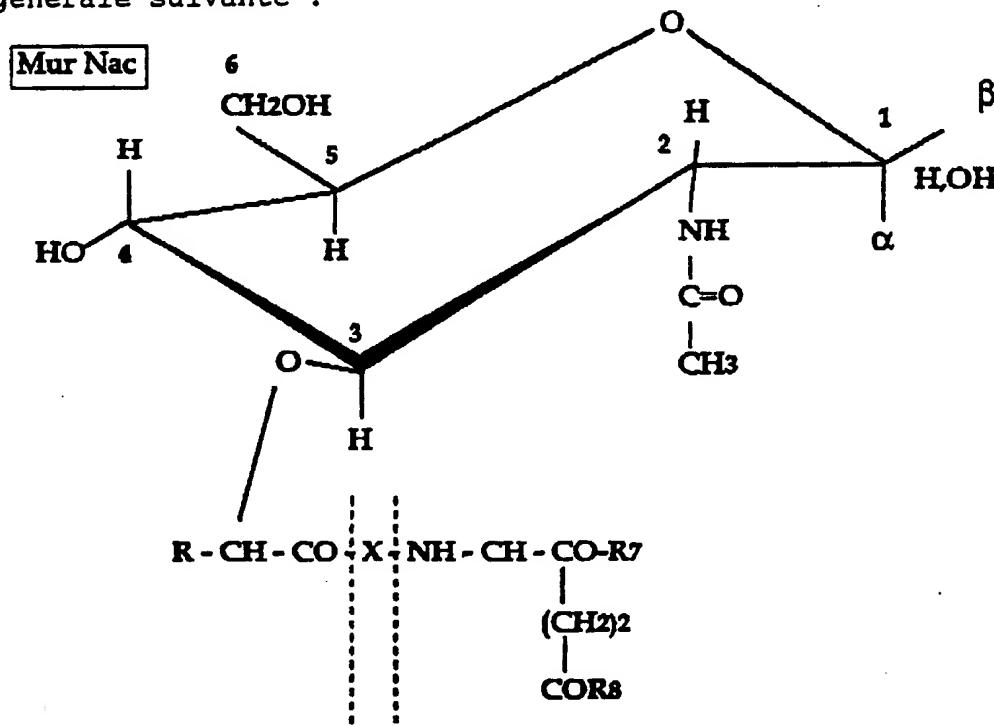
- à potentialiser l'activité biologique de la cytokine considérée permettant aussi d'obtenir les effets recherchés après administrations de doses plus faibles que celles considérées actuellement comme thérapeutiquement nécessaires.
- à ne pas favoriser et éventuellement même inhiber l'induction in vivo par cette cytokine des facteurs limitants ses possibilités d'applications thérapeutiques comme il a été observé dans le cas de l'association avec l'IFN et, le cas échéant et simultanément ;
- à induire la production in situ, d'une part, d'inhibiteurs de ces facteurs limitants, par exemple IL-1 RA et, notamment lorsque la cytokine consiste en un interféron, le récepteur soluble du TNF (STNF-R) et, d'autre part, la sécrétion in situ par les cellules compétentes du système lymphoïde de cytokines, par exemple IL-6 et G-CSF dans le cas des interférons, qui permettent alors l'élargissement du spectre d'action de la cytokine de l'association administrée.

L'invention concerne donc toute association mettant en œuvre une ou plusieurs cytokines et un muramyl-peptide sélectionné en raison de sa capacité à ne pas induire et même à inhiber chez l'homme la sécrétion par ses cellules compétentes des médiateurs biologiques tels IL-1 et/ou IL-8 et/ou TNF, ou à tout le moins à inhiber leurs effets. On connaît en effet le rôle hautement vraisemblable de ces médiateurs dans les effets secondaires liés à l'administration de certaines cytokines. La capacité du muramyl-peptide à potentialiser l'action de la cytokine tout en protégeant l'hôte contre l'induction des cytokines ou d'autres médiateurs nuisibles peut, dans chaque cas, être vérifiée par des essais comparatifs in vivo, de préférence chez l'homme, faisant intervenir, d'une part, la cytokine choisie seule et, d'autre part, une association de cette cytokine avec le muramyl-peptide choisi, et la détection et la mesure sur une base comparative (par exemple dans des dosages RIA ou ELISA utilisant les anticorps appropriés) des taux des cytokines induites étudiées. Les résultats susceptibles d'être obtenus sont illustrés de façon bien entendu non limitatives dans les exemples qui suivent appliqués à l'interféron  $\alpha$  exposés plus loin.

De préférence, les cytokines utilisées seront toujours des cytokines d'origine humaine. Il convient de souligner que cette expression doit être entendue comme couvrant, outre les cytokines naturelles d'origine humaine (on ne peut alors méconnaître les difficultés qu'implique leur isolement en quantités adéquates), les cytokines recombinantes correspondantes produites par des techniques de génie génétique, c'est-à-dire de cytokines néanmoins caractérisées par des séquences en acides aminés identiques à celles de ces cytokines naturelles, ce qui n'exclut néanmoins pas de séquences en acides aminés équivalents différant des

précédentes, notamment par des substitutions, addition ou délétions d'acides aminés n'entrant ni des modifications substantielles des propriétés caractéristiques des cytokines recombinantes à "séquences identiques", ni l'apparition de propriétés nuisibles (par exemple inductions d'anticorps chez l'hôte humain).

De préférence les muramyl-peptides mis en oeuvre dans l'invention sont des muramyl-peptides, notamment choisis parmi ceux qui sont caractérisés par la formule générale suivante :



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est L-alanyle, L-leucyle, L-isoleucyle, L-valyle, L-thréonyle, L-(N-méthyl)-alanyle et R<sub>7</sub> et R<sub>8</sub> sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>H avec x = 1, 2, 3, 4 ou 5 ou des groupes peptidiques comprenant de 1 à 3 résidus d'acides aminés, de préférence lévogyres.

Une catégorie de muramyl-peptides préférés sont ceux dans lesquels :

- R = CH<sub>3</sub>,
- X est L-alanyle ou L-thréonyle,
- R<sub>7</sub> est un groupe O(CH<sub>2</sub>)<sub>x'</sub>H, avec x' = 1, 2, 3 ou 4,
- R<sub>8</sub> est un groupe amino ou un groupe O(CH<sub>2</sub>)<sub>x''</sub>H, avec x'' = 1, 2, 3 ou 4.

Des muramyl-peptides particulièrement préférés sont constitués par le muramétide (R = CH<sub>3</sub>, X = L-Ala, R<sub>7</sub> = OCH<sub>3</sub> et R<sub>8</sub> = NH<sub>2</sub>), le murabutide (R = CH<sub>3</sub>, X = L-Ala, R<sub>7</sub> = OnC<sub>4</sub>H<sub>9</sub> et R<sub>8</sub> = NH<sub>2</sub>) et enfin le muradimétide (R = CH<sub>3</sub>, X = L-Ala, R<sub>7</sub> = R<sub>8</sub> = OCH<sub>3</sub>), et le cas échéant leurs homologues dans lesquels le résidu L-alanyle de leur groupe peptidique est remplacé par un groupe thréonyle.

Il va de soi que les précédentes classes de muramyl-peptides à caractère hydrophile ne sont nullement limitatives. Des muramyl-peptides lipophiles, tels que ceux décrits dans le brevet français n°8407340, peuvent également être mis en oeuvre dans le cadre de l'invention.

Il va enfin de soi que l'on peut aussi avoir recours à tous autres muramyl-peptides adjutants porteurs de substituants en les positions 1, 4 ou 6 du groupe saccharidique, dès lors qu'ils auraient les mêmes effets favorables que les muramyl-peptides préférés mentionnés plus haut.

On remarquera enfin que l'expression "association" n'implique pas que la cytokine et le muramyl-peptide choisis soient nécessairement administrés à l'hôte humain en mélange ou de façons simultanées. Elle s'étend également à toute utilisation ou présentation impliquant leurs administrations à des intervalles de temps non nuls, étant néanmoins entendu que ces intervalles doivent être suffisamment courts pour autoriser les interactions mutuelles des deux

constituants de l'association dans les conditions sus-indiquées.

Ce type d'association mettant en oeuvre interleukines et muramyl-peptides est efficace quand les interleukines sont administrées aux doses suivantes:

- pour l'interféron :

0,05 MU/kg/jour à 10 MU/kg/jour, et de préférence 0,5 MU/kg/jour à 5 MU/kg/jour, une dose optimale étant de 1 MU/kg/jour à 5 MU/kg/jour.

A titre d'indication, l'activité spécifique de l'IFN utilisé est de 4 à 8 UI/mg de protéines.

- pour l'IL-2 :

0,3 MU/kg/jour à 10 MU/kg/jour, de préférence entre 1 MU/kg/jour et 2 MU/kg/jour, sachant que l'activité spécifique de l'IL-2, notamment commercialisée par la société Cetus sous le nom de Proleukin, est de l'ordre de 10 millions d'UI par mg de protéines.

- pour le GM-CSF, les doses préférées sont de 1 à 25 µg/kg et par jour et mieux encore de 5 à 10 µg/kg et par jour.

- les muramyl-peptides, notamment le Murabutide, étant administrés à des doses de l'ordre de 10 à 350 µg/kg/j et de préférence 50 à 200 µg/kg/j ; dose de 100 µg/kg/j est dans tous les cas associée à des doses sub-optimales ou optimales de cytokine.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore à la faveur des exemples non limitatifs décrits ci-après.

Au cours d'essais cliniques effectués chez des volontaires humains sains, de l'IFN α 2a (interféron Roféron A dosé à 3 MU/ml commercialisé par Roche sous la marque ROFERON A, a été administré en association avec des muramyl-peptides, en particulier le muramétide et le murabutide. Il a été montré :

- a) que la sécrétion de Néoptérine qui est le marqueur biologique reconnu signant l'activité immunostimulante de l'IFN était très fortement augmentée, suite à des administrations de doses sub-optimales d'IFN, associées à des doses de Murabutide ou de Muramétide ; il en est de même de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1 RA) dont l'IFN seul induit faiblement la synthèse qui est augmentée considérablement par l'addition de muramyl-peptides montrant ainsi une activité synergique entre IFN et les immunomodulateurs synthétiques ; ceci est également vrai pour le récepteur soluble du TNF (STNF-R) ;
- b) que les sujets recevant l'association montrent une augmentation significative du nombre de cellules de la lignée blanche par rapport au groupe traité par IFN ;
- c) qu'il apparaît, dans le plasma des sujets traités par l'association, des médiateurs de l'immunité : Interleukine 6, G-CSF, alors que l'on n'observe l'induction d'aucun des médiateurs pyrogènes et inflammatoires principaux, plus particulièrement des cytokines IL-1, IL-8 et TNF.

Ces constatations reposent plus particulièrement sur les résultats des essais qui suivent.

- **PREMIERE SERIE D'ESSAIS : injection sous-cutanée de mélanges d'interféron  $\alpha$ -IFN- $\alpha$ -2a avec soit le Murabutide, soit le Muramétide :**

Des sujets sains subissent une série de tests afin de démontrer leur capacité à être inclus dans l'essai. Ils reçoivent par la voie sous-cutanée les mélanges décrits dans le tableau I suivant de Murabutide (MUB) ou Muramétide (MUM) avec de l'Interféron  $\alpha$  2a (IFN  $\alpha$ ).

Tableau I

IFN- $\alpha$ A MUB B MUM	$10^5$ U	$3 \times 10^5$ U	$10^6$ U	$3 \times 10^6$ U	$6 \times 10^6$	0
A 35 $\mu$ g/Kg	A I	A II	A III	A IV	A V	Témoin A35
A 100 $\mu$ g/Kg	A VI	A VII	A VIII	A IX	A X	Témoin A100
B 35 $\mu$ g/Kg	B I	B II	B III	B IV	B V	Témoin B35
B 100 $\mu$ g/Kg	B VI	B VII	B VIII	B IX	B X	Témoin B100
0	Témoin IFN $10^5$	Témoin IFN $3 \times 10^5$	Témoin IFN $10^6$	Témoin IFN $3 \times 10^6$	Témoin IFN $6 \times 10^6$	Placebo

Les sujets sont suivis pendant les trois jours suivant l'administration de l'IFN et/ou des muramyl-peptides et l'ensemble des tests et des examens nécessaires à la réalisation d'un essai de phase I sont effectués.

En particulier les examens suivants sont pratiqués :

Analyse hématologique avec comptes de globules blancs au moment de l'injection puis aux temps 6h, 12h, 24h, 36h, 60h et 72 heures après injection.

Des échantillons de sang sont prélevés avant l'injection et 6h, 24h et 48 heure après l'injection, pour recueillir le serum afin d'effectuer les dosages de Néoptérine, Interleukine 1,6 et 8 G-CSF, IL-1 RA et de TNF- $\alpha$ .

Les comptes leucocytaires sont effectués dans une compteur automatique de cellules COULTER COUNTER.

Les échantillons de sang pour les dosages dans le serum sont centrifugés à 4°C à 3000 rpm pendant 10' juste après le prélèvement. Les sérums sont stockés à -20°C. Les comptes leucocytaires et les dosages de Néoptérine et de cytokine sont effectués en utilisant des kits commerciaux.

RESULTATS DES EXAMENS ET DES TESTS

1) Effets secondaires :

Les effets secondaires qui ont été répertoriés au cours des essais (tels que migraine, fièvre et douleurs

articulaires) ont été très modérés. En particulier, les effets de type syndrome grippal observés aux fortes doses d'IFN 3M et 6M d'unités ne sont pas augmentés par la combinaison avec les muramyl-peptides bien qu'il y ait une forte augmentation de l'activité biologique de l'IFN et apparition d'un profil modifié de cette activité avec synthèse de nouveaux médiateurs biologiques.

2) Comptes leucocytaires :

Les neutrophiles sont les cellules qui sont les plus affectées par des traitements leucopéniants. C'est la baisse du taux de neutrophiles qui est responsable de la baisse des défenses immunitaires non spécifiques chez les sujets soumis à la radiothérapie ou à une chimiothérapie cytotoxique et/ou myélotoxique. Pour simplifier la lecture, seuls donc les comptes de neutrophiles ont été donnés à l'heure où leur variation est la plus notable.

Tableau II

Augmentation du nombre de neutrophiles chez les volontaires sains après administration de l'association muramyl-peptides-IFN  $\alpha$ .

IFN- $\alpha$ administré (Nombre d'unités)	Muramyl peptide administré Composé	Dose (µg/Kg)	No. testé	Compte des neutrophiles % ligne de base <sup>a</sup>
0	Murabutide	100	6	268 $\pm$ 43 <sup>b</sup>
0	Murametide	100	4	279 $\pm$ 67
1 x 10 <sup>5</sup>	-	0	6	143 $\pm$ 34
1 x 10 <sup>5</sup>	Murabutide	100	6	265 $\pm$ 61
3 x 10 <sup>5</sup>	-	0	6	169 $\pm$ 47
3 x 10 <sup>5</sup>	Murabutide	100	6	292 $\pm$ 112
1 x 10 <sup>6</sup>	-	0	6	147 $\pm$ 42
1 x 10 <sup>6</sup>	Murabutide	100	6	207 $\pm$ 46
1 x 10 <sup>6</sup>	Murametide	100	6	232 $\pm$ 78
3 x 10 <sup>6</sup>	-	0	6	144 $\pm$ 19
3 x 10 <sup>6</sup>	Murabutide	100	6	252 $\pm$ 59
3 x 10 <sup>6</sup>	Murametide	100	6	255 $\pm$ 96
6 x 10 <sup>6</sup>	-	0	6	191 $\pm$ 75
6 x 10 <sup>6</sup>	Murabutide	100	6	226 $\pm$ 74
6 x 10 <sup>6</sup>	Murametide	100	6	298 $\pm$ 71

a: Représentent les valeurs les plus élevées observées pendant 24 heures après l'administration.

b: moyenne  $\pm$  déviation standard.

3) Dosages de la Néoptérine :

Les dosages sont effectués sur les sérum prélevés au temps 0, 24h et 48 heures. Un kit RIA (Radio Immuno Assay) (Behring Diagnostic, France) est utilisé. Les résultats sont exprimés en nanomoles/ml, les valeurs normales varient de 4 à 9 nanomoles/ml.

Tableau III

Muramyl peptide	T	IFN $\alpha$						
		0	$10^5$ u	$3 \times 10^5$ u	$10^6$ u	$3 \times 10^6$ u		
0	0	Placebo	Témoin IFN	Témoin IFN	Témoin IFN	Témoin IFN	Témoin IFN	Témoin IFN
	24	6,00 $\pm$ 0,80	6,03 $\pm$ 1,58	5,78 $\pm$ 2,03	3,26 $\pm$ 0,85	3,22 $\pm$ 0,73		
	48	5,50 $\pm$ 0,40	9,02 $\pm$ 2,75	10,21 $\pm$ 2,20	9,20 $\pm$ 2,13	14,39 $\pm$ 2,58		
MUB 35 $\mu$ g/Kg	0	NT	NT	A II	A III	A IV	5,21 $\pm$ 0,73	22,61 $\pm$ 3,94
	24			5,23 $\pm$ 1,06	5,06 $\pm$ 0,77	4,26 $\pm$ 0,34		
	48			9,78 $\pm$ 1,18	13,00 $\pm$ 3,62	17,31 $\pm$ 2,03		
MUB 100 $\mu$ g/Kg	0	Témoin MUB	A VI	A VII	A VIII	A IX	29,14 $\pm$ 0,97	28,29 $\pm$ 0,92
	24	6,37 $\pm$ 0,99	5,97 $\pm$ 1,78	4,91 $\pm$ 0,96	3,83 $\pm$ 0,82	4,14 $\pm$ 0,49		
	48	7,33 $\pm$ 0,75	11,30 $\pm$ 3,64	12,43 $\pm$ 2,67	20,11 $\pm$ 6,73	19,45 $\pm$ 4,09		
MUM 35 $\mu$ g/Kg	0	NT	NT	NT	B III	B IV	4,61 $\pm$ 1,20	21,17 $\pm$ 2,17
	24				4,42 $\pm$ 0,70	5,67 $\pm$ 0,70		
	48				12,48 $\pm$ 1,89	16,56 $\pm$ 1,89		
MUM 100 $\mu$ g/Kg	0	Témoin MUM	NT	NT	B VI	B VII	18,33 $\pm$ 2,33	16,10 $\pm$ 2,74
	24	5,43 $\pm$ 0,66			5,20 $\pm$ 1,95	6,59 $\pm$ 1,62		
	48	7,14 $\pm$ 1,00			16,33 $\pm$ 2,13	20,78 $\pm$ 2,90		
		7,39 $\pm$ 1,37			14,49 $\pm$ 4,72	20,33 $\pm$ 4,18		

On voit sur ce tableau qu'au temps 0 tous les sujets ont des taux normaux de Néoptérine, que les sujets n'ayant reçu qu'un placebo ont un taux constant de Néoptérine et que le Muramétide, ou le Murabutide à la dose de 100  $\mu$ g/Kg n'influencent pas le taux de façon significative.

Aux doses les plus faibles d'Interféron, l'association avec les muramyl-peptides permet d'obtenir des augmentations significatives du taux de Néoptérine. A la dose la plus forte, le Murabutide administré à 100  $\mu$ g/Kg permet certes aussi d'obtenir une augmentation significative, mais beaucoup plus faible que celle observée avec l'association.

#### 4) Dosages de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1 RA) :

Les dosages effectués sur les sérum des sujets ayant reçus  $10^6$  unités d'IFN  $\alpha$  sont rapportés dans le tableau suivant (tableau IV) et on voit un effet très fort de l'association muramyl-peptide et Interféron (ici aussi kit British Biotechnology Products Ltd.).

## Tableau IV

Quantité d'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1 RA) présente dans le sérum de volontaires sains, 6 heures après l'administration de muramyl-peptides et d'IFN  $\alpha$ .

IFN- $\alpha$ administré (Nombre d'unités)	Muramyl peptide administré		Taux sériques d'IL-1 RA (Pg/ml) <sup>+</sup>
	Composé	dose ( $\mu$ g/Kg)	
0	Murabutide	100	496 $\pm$ 326 <sup>ϕ</sup>
$3 \times 10^5$	-	0	258 $\pm$ 113
$3 \times 10^5$	Murabutide	100	10 294 $\pm$ 16 554*
$1 \times 10^6$	-	0	2 093 $\pm$ 1 278
$1 \times 10^6$	Murabutide	100	16 093 $\pm$ 1 621*
$1 \times 10^6$	Murameide	100	16 204 $\pm$ 1 879*
$3 \times 10^6$	-	0	7 332 $\pm$ 3 215
$3 \times 10^6$	Murabutide	100	30 563 $\pm$ 23 410*
$6 \times 10^6$	-	0	15 523 $\pm$ 6 554
$6 \times 10^6$	Murabutide	100	66 870 $\pm$ 36 554*

+: détectés 6 heures après l'administration de composés, les taux avant administration étaient tous inférieurs aux 200Pg/ml ;

$\phi$ : moyenne  $\pm$  déviation standard chez les 6 volontaires d'un même groupe ;

\*: taux substantiellement différents des taux induits par le seul IFN  $\alpha$  ( $p < 0,05$ - $p < 0,005$  dans le test de Mann Whitney Rank)

5) Dosages de l'IL-6 :

Le dosage est effectué par un kit de dosage Elisa (British Biotechnology Products Ltd.) sur les sérum prélevés au temps 0 et après 6 heures. Les chiffres expriment des pg/ml, les valeurs normales sont inférieures à 6 pg.

Tableau V

IFN- $\alpha$ administré (Nombre d'unités)	Muramyl peptide administré		Taux sériques d'IL-6 (Pg/ml) <sup>+</sup>
	Composé	dose ( $\mu$ g/Kg)	
0	Murabutide	100	2.80 $\pm$ 1.60 <sup>s</sup>
0	Murametide	100	4.30 $\pm$ 1.80
$1 \times 10^6$	-	0	2.00 $\pm$ 1.70
$1 \times 10^6$	Murabutide	100	15.00 $\pm$ 12.00*
$1 \times 10^6$	Murametide	100	30.00 $\pm$ 30.00*
$3 \times 10^6$	-	0	3.60 $\pm$ 0.40
$3 \times 10^6$	Murabutide	100	30.00 $\pm$ 23.00*
$3 \times 10^6$	Murametide	100	31.00 $\pm$ 19.00*
$6 \times 10^6$	-	0	34.00 $\pm$ 56.00
$6 \times 10^6$	Murabutide	100	76.00 $\pm$ 58.00
$6 \times 10^6$	Murametide	100	107.00 $\pm$ 72.00*

φ: chaque groupe comprenait 6 volontaires sauf celui pour le muramétide qui n'en comprenait que 4 ;

+: taux mesurés 6 heures après l'administration ; aucun taux n'a été détecté avant l'administration du composé détecté ;

s: moyenne  $\pm$  déviation standard ;

\*: taux substantiellement différents des taux induits par le seul IFN  $\alpha$  ( $p<0,05-p<0,005$  dans le test de Mann Whitney Rank)

On voit sur le tableau V qu'à toutes les doses étudiées le Murabutide et l'Interféron ont agi de façon synergique.

#### 6) Dosages du G-CSF :

Ces dosages ont été effectués en utilisant le kit de British Biotechnology Products Ltd. (cf. tableau VI)

## Tableau VI

Quantité de G-CSF présente dans le sérum de volontaires sains avant et 6 heures après l'administration de l'association muramyl-peptides et IFN  $\alpha$ .

IFN- $\alpha$ administré (Nombre d'unités)	Muramyl peptide administré		Taux sériques de G-CSF après	
	Composé	dose ( $\mu$ g/Kg)	0 heure	6 heures
0	Murabutide	100	< 10	18 $\pm$ 9
0	Muramétide	100	61 $\pm$ 103 <sup>x</sup>	73 $\pm$ 115
$1 \times 10^6$	-	0	< 10	13 $\pm$ 10
$1 \times 10^6$	Murabutide	100	< 10	58 $\pm$ 51 <sup>x</sup>
$1 \times 10^6$	Muramétide	100	< 10	98 $\pm$ 81 <sup>x</sup>
$3 \times 10^6$	-	0	< 10	17 $\pm$ 21
$3 \times 10^6$	Murabutide	100	< 10	77 $\pm$ 65
$3 \times 10^6$	Muramétide	100	< 10	79 $\pm$ 83
$6 \times 10^6$	-	0	< 10	17 $\pm$ 26
$6 \times 10^6$	Murabutide	100	< 10	140 $\pm$ 168
$6 \times 10^6$	Muramétide	100	12 $\pm$ 15	284 $\pm$ 425 <sup>x</sup>

\*: chaque groupe comprenait 6 volontaires, sauf celui qui a reçu le muramétide est le seul qui ne comportait que 4 volontaires ;

x: moyenne  $\pm$  déviation standard ;

\*: taux substantiellement différents des taux induits par le seul IFN  $\alpha$  ( $p < 0,05 - p < 0,005$  dans le test de Mann Whitney Rank)

Dans ce cas également on constate une activité synergique des muramyl-peptides et de l'IFN pour induire du G-CSF.

7) Dosages du récepteur soluble du TNF (STNF-R) :

Ces dosages sont effectués par un test ELISA dans le sérum des sujets ayant un 6M d'unités d'IFN. A cette dose, il y a déjà une augmentation notable du taux de STNF-R mais l'addition de murabutide permet une augmentation significative de la sécrétion de ce médiateur.

Tableau VII

TRAITEMENT		Taux de sTNF-R dans le sérum (pg/ml)		Augmentation nette (pg/ml)
IFN - $\alpha$ unités	Murabutide ( $\mu$ g/Kg)	0 heure	6 heures	
0	100	195 $\pm$ 28	216 $\pm$ 65	31 $\pm$ 37
$6 \times 10^6$	0	229 $\pm$ 37	389 $\pm$ 95	159 $\pm$ 108
$6 \times 10^6$	100	232 $\pm$ 35	576 $\pm$ 139	345 $\pm$ 120*

\*: significativement différent des taux induits par l'IFN- $\alpha$  seul ( $p = 0,005$  Mann Whitney Rank Test)

8) Dosages de l'IL-1, IL-8, TNF  $\alpha$  :

Ces dosages ont été effectués dans les mêmes conditions et aucune de ces cytokines n'a pu être mise en évidence dans les sérum testés. Les kits utilisés sont tous de British Biotechnology Products Ltd.

9) DEUXIEME SERIE D'ESSAIS :

9.1. Association d'IFN et de MURABUTIDE :

1) Administration unique chez l'homme :

Les sujets ayant participé à l'étude ont été examinés pour déterminer l'influence des différents traitements sur l'apparition éventuelle des signes cliniques suivants : mal de tête, arthralgie-myalgie, fièvre, frissons, asthénie, nausées-vomissements. Le résumé des observations effectuées est donné sur le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Traitement	Fréquence et intensité moyenne des effets secondaires				
	Mal de tête	Arthralgie/ Myalgie	Fièvre	Frissons	Asthénie
IFN-alpha (6 MU)	6/6 <sup>a</sup> (1.5) <sup>b</sup>	4/6(1.0)	6/6(1.2)	3/6(0.8)	0/6(0)
IFN-alpha (1 MU) + Murabutide (100 µg/kg)	6/9(1.0)	5/9(0.8)	6/9(1.2)	6/9(1.2)	1/9(0.1)
IFN-alpha (6 MU) + Murabutide (100 µg/kg)	4/6(1.3)	3/6(0.7)	6/6(2.3)	2/6(0.7)	0/6(0)
IFN-alpha (1 MU) + Muramétide (100 µg/kg)	4/6(1.0)	6/6(1.7)	6/6(1.7)	3/6(0.8)	1/6(0.2)
IFN-alpha (6 MU) + Muramétide (100 µg/kg)	5/6(1.2)	4/6(0.8)	5/6(1.2)	4/6(1.2)	3/6(0.7)

a: nombre de sujets ayant des effets secondaires par rapport au nombre total de sujets testés.

b: intensité moyenne des effets secondaires. Le score suit les règles de CTC-NCI. Ce score va de 0 pas d'effet secondaire à 4 effets interdisant l'usage du médicament dans l'indication considérée. Les grades 1 et 2 correspondent à des effets indésirables mais tolérables.

On voit sur ce tableau que les effets secondaires observés sont à peu près équivalents dans tous les groupes. Le groupe qui a reçu les 6 MU d'IFN seul présentant un taux de fréquence et d'intensité moyennes des effets secondaires égal ou supérieur à tous les groupes associant IFN- $\alpha$  et Murabutide ; pour certains de ces effets, on peut observer notamment dans l'association IFN(6 MU) + Murabutide une diminution de la fréquence et de l'intensité des effets secondaires.

Le tableau IX montre les effets biologiques obtenus dans les mêmes groupes, ces résultats indiquant que les effets biologiques obtenus associant le Murabutide ou le Muramétide avec l'interféron  $\alpha$  à 1 MU sont au moins égaux ou supérieurs à ceux obtenus avec l'interféron  $\alpha$  seul à la dose de 6 MU.

TABLEAU IX

Traitement	Moyenne des niveaux de cytokines induites*			
	G-CSF (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 RA (ng/ml)	Comptes des neutrophiles en % de la ligne de base <sup>Δ</sup>
IFN-alpha (6 MU)	17 ± 26	34 ± 56	15.5 ± 6.6	191 ± 74
IFN-alpha (1 MU) + Murabutide (100 µg/kg)	55 ± 56	15 ± 12	16.1 ± 1.6	207 ± 46
IFN-alpha (6 MU) + Murabutide (100 µg/kg)	135 ± 166	75 ± 59	66.9 ± 36.5	226 ± 74
IFN-alpha (1 MU) + Muramétide (100 µg/kg)	94 ± 76	30 ± 30	16.1 ± 1.8	232 ± 78
IFN-alpha (6 MU) + Muramétide (100 µg/kg)	273 ± 412	107 ± 72	111 ± 123	296 ± 70

\* : testé 6 heures après l'injection

Δ : comptes effectués 6 heures à 12 heures après l'injection.

Il est donc très clair d'après ces tableaux que l'invention permet de bénéficier des effets synergiques de l'association Murabutide-cytokines dans les effets recherchés sans que les effets secondaires soient augmentés. Il faut noter que l'administration de 1 MU d'IFN associé au Murabutide ou au Muramétide est plus active que celle de 6 MU d'IFN seul. De plus, l'activité des 6 MU est magnifiée par l'addition de Murabutide ou de Muramétide mais les effets secondaires diminués.

2) Administrations répétées chez l'homme :

Des essais de phase I/IIa ont été réalisés sur 3 groupes de 6 volontaires sains qui ont reçu les traitements suivants aux jours 1, 3 et 5 :

- a) IFN- $\alpha$ 2a(1 MU) Roferon,
- b) Murabutide 7 mg
- c) l'association des deux immunostimulants.

Ces traitements ont été très bien tolérés et en particulier aucun effet secondaire notable n'a été constaté chez les sujets du groupe C même après la troisième injection.

Le potentiel thérapeutique des traitements a été évalué :

a) en examinant les effets secondaires :

En étudiant leur influence sur le nombre de neutrophiles circulants. Les résultats transcrits sur le tableau X montrent que l'association Murabutide + IFN permet d'obtenir une augmentation du nombre de neutrophiles significativement plus importante que celle obtenue par les immunostimulants administrés seuls et de façon intéressante ce phénomène est aussi marqué après la cinquième qu'après la troisième injection.

TABLEAU X

Traitement	Jour du Traitement	Comptes de neutrophiles (% de la ligne de base) après :		
		3 heures	6 heures	12 heures
• IFN-alpha	1	124±27	122±30	151±20
• Murabutide	1	139±26	256±51	227±46
• IFN-alpha + murabutide	1	112±22	187±70	156±60
• IFN-alpha	3	121±35	126±54	151±51
• Murabutide	3	133±24	182±27	176±59
• IFN-alpha + murabutide	3	116±19	266±112	205±47
• IFN-alpha	5	104±11	117±27	149±21
• Murabutide	5	107±19	150±28	153±23
• IFN-alpha + murabutide	5	106±11	210±103	205±56

b) en analysant l'influence des différents traitements sur l'induction de gènes choisis pour leur importance dans la manifestation de l'activité biologique de l'interféron. Ces expériences ex vivo ont été effectuées sur les cellules du sang circulant des sujets traités.

Les produits des gènes suivants : PKR, MxA, 2-5 OAS, 9-27 et 15 Kd sont les médiateurs des activités antitumorales et antivirales de l'IFN, il est donc important de vérifier que le Murabutide associé à l'IFN permet d'obtenir des niveaux d'induction au moins égales à ceux observés avec l'IFN seul.

L'analyse des mRNAs produits par les cellules des sujets des différents groupes a été effectuée par la technique des "Northern blots" et par hybridation avec des sondes nucléotidiques spécifiques suivant Schreck et al 1992, Clin. Exp. Immunol. vol. 90, p.

188-192. Cette étude a porté sur des cellules prélevées 4 heures après les traitements car c'est le temps le plus précoce pour observer l'influence de l'IFN sur l'induction des gènes sensibles à son action.

Les résultats obtenus montrent que l'association Murabutide-IFN est au moins aussi active que l'IFN seul pour activer les gènes considérés.

L'ensemble des résultats obtenus dans les essais cliniques où l'association Murabutide-IFN a été administrée 3 fois à deux jours d'intervalle montre :

- que des traitements répétés sont aussi bien tolérés que les administrations uniques,
- que l'activité biologique de l'association se manifeste après la troisième administration avec la même amplitude qu'après la première en particulier en ce qui concerne l'augmentation du nombre des neutrophiles et l'induction des gènes impliqués dans les activités antivirales et antitumorales.

3) Experiences in vitro sur l'influence de l'association Murabutide et IFN- $\alpha$  sur la synthèse de médiateurs par les monocytes humains :

Du sang prélevé à des volontaires sains a été incubé in vitro avec différentes combinaisons associant le Murabutide et l'IFN- $\alpha$ . Le Murabutide a été utilisé à la dose de 20  $\mu$ g/ml et l'IFN de 30 à 100  $\mu$ /ml. A différents temps au cours de cette incubation, des échantillons du sang sont prélevés et les cellules mononucléées séparés sur gradient de Ficoll. Le RNA total est extrait, purifié et séparé par électrophorèse. Il est ensuite analysé suivant la méthode de Schreck afin de déterminer par technique d'hybridation quels sont les gènes qui ont été induits

par le traitement. Cette technique a permis de montrer que des cytokines très importantes sont produites par les cellules sous l'influence de l'association Murabutide-IFN- $\alpha$  à côté des cytokines comme l'IL-1 RA, le sTNFR2, l'IL-6 et le G-CSF dont la présence peut être décelée dans le sérum. Les résultats indiqués dans le tableau XI et obtenus *in vitro* confirment les observations faites au cours des essais (décris plus haut) effectués *in vivo* chez des volontaires sains et montrant la présence d'IL-1 RA, de sTNFR2, d'IL-6 et de G-CSF dans les sérum.

D'autres cytokines, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12, dont le rôle de médiateurs intercellulaires est très important, ne peuvent être décelées dans la circulation mais les techniques d'hybridation ont montré des quantités élevées de leur RNAs correspondants. Ces cytokines sont très impliquées dans la défense contre les infections intracellulaires.

TABLEAU XI

Incubation des cellules		Taux moyens des cytokines sécrétées		
IFN-alpha	Murabutide 20 $\mu$ g/ml	IL-6 pg/ml	sTNFR2 pg/ml	IL-1 RA ng/ml
-	-	1.1 $\pm$ 1.6	958 $\pm$ 290	0.3 $\pm$ 0.2
-	+	15.5 $\pm$ 11.3	1171 $\pm$ 478	7.8 $\pm$ 6.0
30 u	-	1.9 $\pm$ 1.7	1098 $\pm$ 222	3.5 $\pm$ 4.6
30 u	+	460.8 $\pm$ 330.9	1953 $\pm$ 483	50.8 $\pm$ 43.8
100 u	-	1.5 $\pm$ 0.6	1150 $\pm$ 286	5.0 $\pm$ 4.5
100 u	+	400.8 $\pm$ 313.4	1486 $\pm$ 625	52.0 $\pm$ 55.2

4) Expériences in vivo chez la souris swiss montrant l'activité de l'association du Murabutide-IFN dans un modèle de choc toxique:

Ces expériences montrent l'effet de l'association du Murabutide-IFN dans un modèle de choc toxique et, en particulier, un effet protecteur contre le choc endotoxique et une activité synergique avec l'interféron.

L'administration de D-galactosamine avec du lipopolysaccharide (LPS) dans des souris swiss a pour propriété d'induire un choc endotoxique avec au moins 70% de mortalité dans les 24-48 heures. L'effet prophylactique ou thérapeutique du Murabutide a été étudié dans ce modèle afin d'évaluer son activité anti-inflammatoire lorsqu'il est administré seul ou en combinaison avec IFN- $\alpha/\beta$ . Le prétraitement des souris avec le Murabutide ou avec l'interféron  $\alpha/\beta$  ne fait pas apparaître un effet prophylactique à l'égard d'un challenge avec le mélange galactosamine/LPS (Tableau XII). Au contraire, le prétraitement avec une combinaison de Murabutide et d'interféron  $\alpha/\beta$  induit une protection significative avec une incidence de mortalité de seulement 33% (contre 78% dans les contrôles).

L'administration de Murabutide dans les souris 1 heure après l'induction du choc endotoxique a un effet curatif significatif qui est bien meilleur que celui induit par l'administration de l'interféron  $\alpha/\beta$ . D'autre part, le traitement avec une combinaison de Murabutide et d'interféron  $\alpha/\beta$  démontre une activité thérapeutique hautement synergique avec près de 80% de protection des souris contre la mortalité due au choc endotoxique.

TABLEAU XII

Protection contre le choc endotoxique dans un modèle de souris galactosamine, par administration prophylactique ou thérapeutique de Murabutide avec de l'interféron  $\alpha/\beta$  de souris.<sup>1)</sup>

Traitemen	Nombre de souris mortes par total testé	Moyenne % de mortalité		
		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Composé 2)				
NaCl				
	-	- 3 hrs	6/9	7/8
Murabutide	15 mg/kg	- 3 hrs	7/9	7/8
IFN $\alpha/\beta$	5x10 <sup>5</sup> IU/kg	- 3 hrs	8/9	5/8
FN $\alpha/\beta$ +	5x10 <sup>5</sup> IU/kg +	- 3 hrs	7/9	5/8
Murabutide	15 mg/kg	- 3 hrs	7/9	5/10
FN $\alpha/\beta$	1.25x10 <sup>6</sup> IU/kg	- 3 hrs	7/9	8/8
	g			
FN $\alpha/\beta$ +	1.25x10 <sup>6</sup> IU/kg	- 3 hrs	1/9	4/8
Murabutide	g + 15 mg/kg			
NaCl	-	+ 1 hr	6/9	7/8
Murabutide	15 mg/kg	+ 1 hr	2/9	3/8
FN $\alpha/\beta$	11.25x10 <sup>6</sup> IU/kg	+ 1 hr	6/9	3/8
FN $\alpha/\beta$ +	1.25x10 <sup>6</sup> IU/kg	+ 1 hr	1/9	1/8
Murabutide	g + 15 mg/kg			

- 1) Les souris swiss ont été éprouvées en intrapéritonéale au temps 0 avec 18 mg de D-galactosamine + 50 ng de LPS. La mortalité a été mesurée après 48 heures.
- 2) Les composés sont administrés en intraveineuse soit 3 heures avant ou 1 heure après l'épreuve.

Les résultats montrent clairement que la combinaison d'interféron  $\alpha/\beta$  + Murabutide conduit à une diminution drastique de la mortalité des souris éprouvées par la D-galactosamine et le LPS, que ce soit en prophylactique (33% de mortalité contre 75% à 81% en l'absence de cette composition) et 12% de mortalité en thérapeutique contre 30% à 73% en l'absence de la combinaison IFN- $\alpha/\beta$  + Murabutide.

#### 9.2. Association avec le GM-CSF :

Des études similaires à celles décrites plus haut ont été réalisées pour étudier l'association Murabutide-GM-CSF. Ces études ont été faites in vitro sur les cellules de volontaires sains après incubation avec les immunomodulateurs seuls ou associés.

##### a) Analyse au niveau de RNA :

Chez tous les donneurs testés, on a pu observer une induction de la synthèse du récepteur de l'interféron- $\gamma$  et de la synthèse de l'IL-1RA.

##### b) Analyse des surnageants :

Certaines cytokines ont été recherchées et mesurées dans les surnageants (voir tableau XIII). Cette analyse confirme que des quantités importantes d'IL-1 RA sont produites sous l'influence de l'association indiquant que le Murabutide devrait permettre une meilleure tolérance du GM-CSF dont une partie des effets secondaires sont liés à des phénomènes inflammatoires.

Les résultats obtenus dans ces expériences indiquent donc que comme dans le cas de l'IFN, l'association Murabutide-GM-CSF permet l'induction importante de médiateurs n'apparaissant pas lors des traitements séparés. De plus, l'induction de ces médiateurs indique que le Murabutide doit augmenter la tolérance à l'administration de GM-CSF.

TABLEAU XIII

Incubation des cellules		Taux moyens des cytokines sécrétées		
Cytokine (ng/ml)	Murabutide 20 µg/ml	IL-6 pg/ml	sTNFR2 pg/ml	IL-1 RA ng/ml
-	-	1.1±1.6	958±290	0.3±0.2
-	+	15.5±11.3	1171±478	7.8±6.0
GM-CSF(1)	-	2.0±1.5	1027±624	4.0±1.4
GM-CSF(1)	+	34.8±25.2	1396±341	57.1±26.9
GM-CSF(5)	-	2.3±2.1	1359±350	8.7±10.0
GM-CSF(5)	+	52.8±70.9	1970±545	76.3±47.0

**9.3. Association avec l'IL-2 :**

1) Expérience in vivo chez la souris utilisant le Muramétide :

L'IL-2 a montré avoir des effets thérapeutiques importants dans des cas de carcinomes rénaux métastasiques et de mélanomes malins. Son utilisation est néanmoins limitée par ses effets toxiques très importants qui produisent un syndrome ressemblant au choc toxique qui peut être léthal dans 25% des cas.

Un modèle murin a été développé chez la souris C3H/HeN. Des cellules de sarcome KHT sont administrées par la voie veineuse. Après 4 jours et 6 jours elles sont traitées par :

- a) le muramétide seul,
- b) l'IL-2,
- c) l'association des deux immunomodulateurs,
- d) un quatrième groupe n'est pas traité.

- Muramétide en combinaison avec l'interleukine-2 comme traitement en immunothérapie pour les cancers disséminés :

L'immunothérapie avec l'IL-2 a été démontrée comme efficace dans le traitement des carcinomes métastatiques de cellules rénales et de mélanomes malins. En dépit de son efficacité, l'administration d'IL-2 est accompagnée d'une série d'effets secondaires de type septique qui ont limité les doses administrables et restreint son utilisation uniquement dans des centres médicaux spécialisés. Quand il est administré avec l'IL-2, le peptide adjuvant du muramétide réduit la toxicité de l'IL-2 chez les souris porteuses de tumeurs. Les souris recevant l'IL-2 seule s'agglutinent entre elles et sont généralement inactives. Dans les études de survie, les souris recevant la combinaison d'IL-2 et du muramétide survivent à celles recevant l'IL-2 seule. Bien que le muramétide seul n'a aucune activité antitumeur dans la souris porteuse de métastases de sarcome pulmonaire, la combinaison d'IL-2 et de muramétide est plus efficace que l'IL-2 seule. Ces données préliminaires suggèrent que le muramétide peut être utile en combinaison avec l'IL-2 comme moyen de réduire la toxicité de fortes doses de traitement à l'IL-2.

2) Expériences *in vitro* sur des cellules humaines utilisant le Murabutide :

Dans des expériences réalisées sur des cellules de volontaires sains, il a été montré que l'association IL-2 avec le Murabutide permet d'obtenir un taux très élevé de RNA codant pour l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12. Ces 2 cytokines sont essentielles pour l'activité antitumorale. Il faut noter qu'il n'y a pas de synthèse de TNF dont la production lors de traitements par IL-2 est responsable d'une grande partie des effets secondaires en particulier la cachexie.

L'ensemble des résultats in vivo et in vitro obtenus indique clairement que l'association du

Murabutide avec l'IL-2 doit permettre un meilleur effet thérapeutique avec moins d'effets secondaires à la fois parce que des doses d'IL-2 moins importantes seront nécessaires et parce que le Muraméotide ou le Murabutide diminuent les effets toxiques de l'IL-2.

Les résultats obtenus montrent donc ce qui suit :

**A) Notamment à propos de l'interféron:**

- a) A des doses pour lesquelles il est incapable de modifier significativement le taux de synthèse de Néoptérine lorsqu'il est administré seul, l'association de l'IFN  $\alpha$  avec le Murabutide ou le Muramétide permet d'obtenir des taux importants de ce marqueur. Aux doses plus élevées d'IFN, l'association permet une élévation significative de son taux. La néoptérine étant considérée comme un des marqueurs principaux de l'activité de l'interféron au niveau des macrophages humains, ces résultats montrent donc que les effets de l'IFN  $\alpha$  liés à l'activation de ces cellules peuvent être obtenus avec des doses réduites, bien tolérées ; une remarque similaire s'applique à l'IL-1 RA dont on observe des taux extrêmement élevés après administration de l'association. On peut même observer qu'il y a une activité synergique entre IFN et murabutide ou muramétide et que l'on obtient un effet-dosé, puisqu'approximativement un doublement du taux d'IL-1 RA est obtenu quand la dose d'IFN est doublée. La même observation peut être faite pour STNF-R qui est induit par IFN seul mais faiblement en comparaison des taux induits par l'association.
- b) L'association l'IFN avec le muramyl-peptide permet d'obtenir des comptes leucocytaires plus élevés que ceux des témoins ;
- c) L'association des muramyl-peptides avec l'IFN  $\alpha$  a de plus provoqué la sécrétion sélective d'autres

cytokines ou médiateurs immunitaires. En effet, on peut noter chez les sujets traités par l'association, qu'il y a des différences significatives entre leur taux sérique d'IL-6, de G-CSF et de STNF-R et ceux des sujets traités par l'IFN seul ou le Murabutide seul. Par contre, on n'observe pas d'augmentation des taux d'IL-1, d'IL-8 ou de TNF  $\alpha$ . Cet effet sélectif, de l'association des muramyl-peptides avec l'Interféron sur la sécrétion de cytokines est tout à fait inattendu et particulièrement intéressant. Il ne pouvait être prédit à partir des propriétés connues des deux composants administrés seuls. Cette découverte offre des possibilités d'applications très intéressantes.

B) Le G-CSF est la cytokine responsable de la différentiation des cellules souches vers la lignée granulocyttaire et de leur régénération après un traitement myélotoxique et l'IL-6 et est également très impliquée dans l'hématopoïèse. Ainsi la possibilité d'associer à l'activité de l'IFN  $\alpha$  exogène les activités des G-CSF et IL-6 endogènes induites par cet IFN  $\alpha$  exogène administré à l'hôte, constitue une avance thérapeutique importante. En effet :

- a) cette association se fait dans des conditions d'effets secondaires minimums ; les doses d'IFN nécessaires sont peu élevées ;
- b) elle intervient dans des conditions beaucoup plus physiologiques de dosages et de disponibilité que si l'on administrait un "cocktail" des cytokines correspondantes ;
- c) l'absence de sécrétion de TNF, d'IL-1 et d'IL-8 est un élément particulièrement favorable, d'autant plus qu'il y a sécrétion de STNF-R qui se combinant à d'éventuelles quantités de TNF

neutraliserait son action comme le ferait IL-1 RA dans l'éventualité d'un quantité active d'IL-1. Cet ensemble de données conduit à de nouvelles applications thérapeutiques en médecine humaine et à un élargissement des domaines d'application thérapeutique existants. En particulier :

1. toutes les situations où l'intérêt thérapeutique de l'IFN  $\alpha$  peut désormais être mis en évidence. En particulier, l'invention permet l'extension des interférons sous cette forme d'associations à des traitements d'affections tumorales qui ne sont guère envisagées à ce jour, essentiellement en raison de la trop grande importance relative des effets secondaires examinés plus haut. On peut penser au sarcome de Kaposi à la leucémie chronique myéloïde, à différents carcinomes, au myélome multiple, au mélanome, à diverses leucémies et lymphomes. L'invention permet, grâce à l'effet de stimulation exercée quant à la production de cytokines thérapeutiquement utiles, de reconstituer au moins en partie les systèmes complexes biologiques physiologiques normalement impliqués dans le maintien de l'homéostase, grâce à l'interaction de leurs constituants avec d'autres facteurs de régulation solubles ou associés aux cellules.
2. plus particulièrement les situations impliquant un déficit des lignées granulocytaire spontané, comme dans le cas de syndromes myélodisplasiques, ou induit par des traitements médicamenteux, notamment à base de cytokines. L'un des grands avantages de l'utilisation de l'association conforme à l'invention réside dans la protection de l'hôte contre les actions leucopéniantes des mêmes cytokines utilisées seules, de sorte que des composés cytotoxiques mettant en œuvre la

cytokine appropriée, notamment pour le traitement de cancers, de maladies infectieuses, ou de déficiences d'origine génétique peuvent être prolongés jusqu'à autoriser un effet curatif plus sûr. En d'autres termes, l'association permet soit un ralentissement de la déplétion, soit même une suffisante restauration du système granulocytaire (voire même une réparation de la moelle) chaque fois que celle-ci est affectée par un traitement cytotoxique (chimiothérapie ou radiothérapie cancéreuse, traitement du SIDA par l'AZT) et/ou immunosupresseur. Une association peut aussi être utilisée dans des situations conformes à l'invention (cytokine et muramyl-peptide) où les agents cytotoxiques utilisés sont différents de la cytokine de l'association, concurremment avec le traitement cytotoxique du genre en question, ou chaque fois que le traitement avec l'agent cytotoxique est interrompu aux fins de permettre une restauration des phagocytes, des plaquettes sanguines et une stimulation de la moelle osseuse. Enfin, l'invention ouvre la voie à une reconstitution plus rapide du système hématopoïétique chez des personnes dont le système immunitaire avait été auparavant inhibé, voire même détruit, par exemple pour autoriser une transplantation de moelle osseuse ou plus généralement de tissus ou organes allogènes.

L'induction d'IL-6 permet aussi de penser que l'association à un effet sur la mégacharyocytopoïèse et donc sur la régénération des plaquettes. Ceci a d'ailleurs été observé chez quelques uns des sujets qui ont été suivis sur deux semaines.

Dans le cadre de cet effet antineutropénique ou antileucopénique, l'invention est également relative à des compositions comportant une association d'une cytokine, par exemple l'interféron ou une interleukine en association d'une part avec le GM-CSF et, d'autre part, avec un muramyl-peptide et notamment un Murabutide ; en effet, comme nous l'avons vu, la cytokine a un effet thérapeutique chez l'homme de diminution des tumeurs ou d'une infection virale, mais parmi tous ces effets secondaire, elle confère au patient un neutropénie ou une leucopénie grandement préjudiciable.

Le GM-CSF, quant à lui, lorsqu'il est administré seul confère des effets secondaires de type inflammatoires très importants aux patients. Mais, il a également un effet antineutropénique ou antileucopénique par l'augmentation du nombre de neutrophiles et de leucophiles dans le sang ; nous avons vu que le muramyl-peptide, tel le Murabutide ou le Muramétide, répare également l'effet neutropénique ou leucopénique des cytokines.

L'association du GM-CSF, d'une cytokine, par exemple de l'interféron ou de l'IL-2, et du muramyl-peptide est donc une association de trois produits : le Murabutide et le GM-CSF ayant un effet réparateur cumulatif de la neutropénie et permettant d'éliminer les effets secondaires du GM-CSF seul.

c) On observe également une production importante d'IL-1 RA et de STNF-R en l'absence de sécrétion de TNF, d'IL-1 et d'IL-8. Ceci conduit à un second volet d'applications. Tout d'abord vers la prévention et le traitement du choc septique dans lequel l'IL-1 et le TNF jouent un rôle primordial. Les autres indications sont toutes celles où il est nécessaire de s'opposer à l'inflammation, comme dans les cas d'arthrites

rhumatoïdes ou de certaines maladies auto-immunes ou de maladies induites dans le cas de transplantations de moelle, de tissus ou d'organes, par une réaction du greffon contre l'hôte.

D) Naturellement l'association est tout aussi utile pour le traitement de maladies virales telles les hépatites chroniques C ou B ou des infections virales respiratoires, qu'il s'agisse d'un traitement dans lequel la cytokine est directement impliquée en sa capacité anti-virale (par exemple cas de l'interféron) ou d'un traitement de substitution ou s'intercalant entre des traitements antiviraux qui doivent être interrompus par intermittences (par exemple inhibition de la multiplication virale de HIV par l'AZT ou d'autres dérivés de nucléosides ayant une spectre d'action antivirale similaire).

D'une façon générale, l'invention concerne donc toute association répondant aux critères sus-indiqués, contenant, le cas échéant, en outre un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Sans qu'il y ait lieu de s'y limiter ces compositions pharmaceutiques sont avantageusement constituées de solutions pouvant être administrées par voie parentérale, notamment sous-cutanée, intraveineuse, ou par perfusion. Les muramyl-peptides peuvent être administrés oralement soit seuls, soit sous une forme galénique assurant leur protection (par exemple, en capsulation dans des liposomes capsules ou microsphères permettant le franchissement de la barrière gastrique. Il en est de même pour les cytokines utilisées, notamment les interférons.

Dans le cas de l'association interféron et muramyl-peptide, les doses préférées d'IFN pour une injection seront de l'ordre de  $5 \times 10^4$  à  $5 \times 10^6$  (0,05M à 5M) Unités internationales et les doses de muramyl-peptide, notamment de muramétide ou de murabutide, sont de l'ordre de 10  $\mu\text{g}$  à 250  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

Pour le cas des associations GM-CSF et muramyl-peptides, des doses préférées seront respectivement de 1 à 25 µg/kg de GM-CSF pour 10 µg à 250 µg/Kg de muramyl-peptides.

Il va de soi que les doses indiquées ci-dessus n'ont d'autre valeur que celle d'illustrer l'invention. Il relève naturellement du clinicien de déterminer quelles seront les doses à associer des constituants de l'association, selon l'état du patient et de l'affection dont il souffre.

L'invention concerne aussi l'association avec l'IL-2 qui possède des activités anti-tumorales reconnues, en particulier vis-à-vis des métastases du carcinome rénal ou d'autres cancers, mais dont l'index thérapeutique est extrêmement faible. Les doses préférées pour une injection seraient de 1 à 10 millions d'unités Kg/jour d'IL-2 associées à de 10 µg à 250 µg/Kg de muramyl-peptides.

A titre d'exemples supplémentaires, l'invention concerne aussi les associations avec un muramyl-peptide du genre indiqué, de IL-6, de IFN $\gamma$  et/ou du facteur TGF $\beta$  (abréviation anglaise de "Transforming Growth Factor" ou "facteur de transformation de la croissance"). On leur attribue une implication importante dans la régulation négative d'immunoglobulines de classe IgE, responsables de phénomènes allergiques. Par "régulation négative", il faut entendre une réduction de la production d'immunoglobulines de classe IgE relativement à la production d'autres immunoglobulines notamment des IgA et IgG. L'administration de l'association d'une ou plusieurs de ces cytokines en association avec un muramyl-peptide permet une modulation du profil des immunoglobulines synthétisées par les cellules du système immunitaire, dans un sens favorisant la production de IgG et IgA par rapport à celle des IgE,

voire même au détriment de celles-ci. Ce résultat témoigne de la possibilité d'utiliser l'association conforme à l'invention pour le traitement des allergies en thérapeutique.

Les doses de chacun des constituants de l'association, notamment lorsqu'il s'agit de les administrer par voie parentérale, seraient notamment les suivantes, pour environ de 10 µg à 250 µg/Kg de muramyl-peptide :

- de 0,05 M à 10 M d'UI d'IFN $\gamma$ /kg et par jour, de préférence 0,5 M d'UI/kg/jour à 5 M d'UI/kg/jour et encore de préférence de 1 M d'UI/kg/jour à 5 M d'UI/kg/jour,
- de 0,5 µg à 100 µg/Kg de TGF $\beta$ , et/ou
- de 0,1 µg à 25 µg/Kg de IL-6.

Il va enfin de soi que les revendications qui suivent ne peuvent qu'étendre leurs effets à des compositions, qui mettraient en jeu en association avec la cytokine choisie, une molécule du type muramyl-peptide utilisable en clinique humaine ou une molécule qui en présenterait les propriétés biologiques essentielles. On mentionnera à titre d'exemples les produits suivants :

- Nac Mur-L-Thr-D isoGln-sn glycéryl dipalmitoyle
- NAc-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-2 (1',2'dipalmitoyl)-sn-glycéro-3'-phosphoryléthylamide (MTP-PE) ;
- N<sub>2</sub> (Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln) N<sub>6</sub>-stearoyl-L-Lysine (Muroctasine) ou MDP-Lys (L18) ;
- NAc-glucosaminyl-NAc-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-Glyceryl-dipalmitate (DTP-GDP) ou NAc-glucosaminyl-NAc-Mur-L-Thr-D-iso-Gln-L-Ala-Glyceryl-dipalmitate ;
- Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln ;
- Nac-Mur-D-Ala-D-isoGln-1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol
- Nac-Mur-D-Thr-D-isoGln-1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol

- Les analogues du MDP dans lesquels le 2<sup>ème</sup> acide aminé, la glutamine est remplacée par une Norleucine, et qui sont dépourvus d'activité pyrogène ;
- Les dérivés ou analogues (obtenus par fractionnement ou mieux par synthèse) de produits bactériens suffisamment dépourvus de toxicité, notamment de pyrogénicité, parmi lesquels des endotoxines, notamment monomères ou peptidoglycans, capables d'activer les cellules immunologiquement compétentes et d'induire des cytokines chez l'homme.

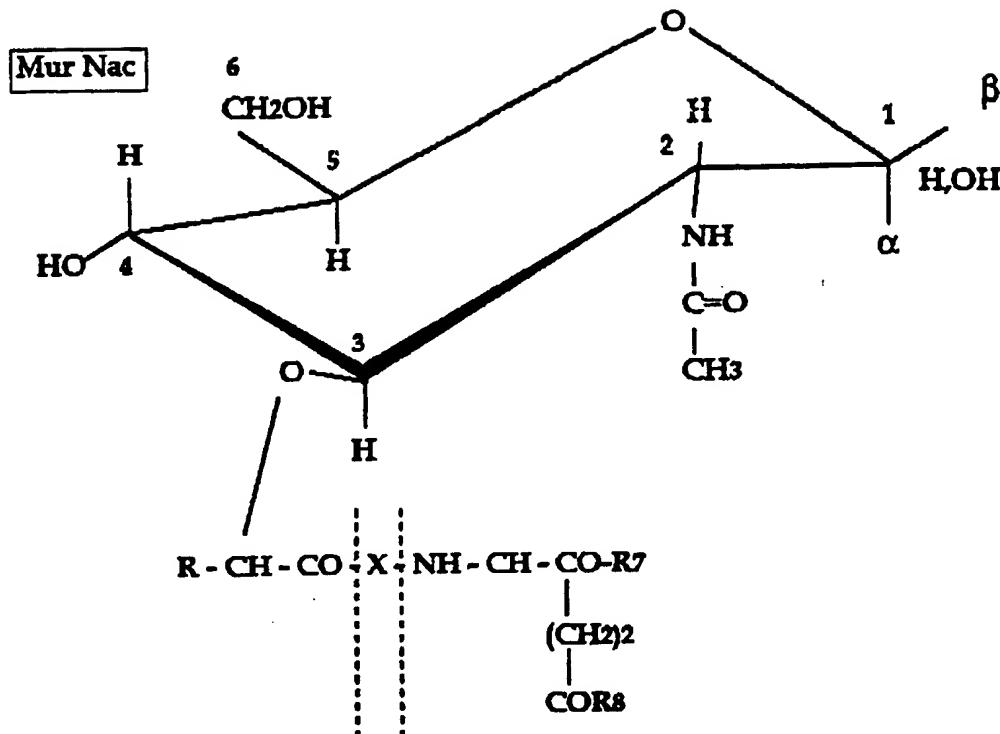
## REVENDICATIONS

1. Composition associant, aux fins de leur application en thérapeutique humaine, au moins une cytokine naturelle ou recombinante, de préférence humaine, avec au moins un muramyl-peptide choisi parmi ceux qui, lorsqu'ils sont administrés in vivo en association avec un interféron, induisent également la production accrue in vivo d'un antagoniste IL-1 RA du récepteur de l'interleukine I et, de préférence, n'induisent pas un accroissement des cytokines IL-1, TNF et IL-8.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que, dans les conditions d'administration susdites, lesdits muramyl-peptides induisent également in vivo une synthèse accrue de IL-6 ou de G-CSF ou des deux à la fois.

3. Composition associant, aux fins de leur application en thérapeutique humaine, au moins une cytokine naturelle ou recombinante, de préférence humaine, avec au moins un muramyl-peptide choisi parmi ceux qui, lorsqu'ils sont administrés à l'homme avec une cytokine thérapeutiquement active mais ayant des effets antineutropéniques ou anti-leucopéniques, ou les deux à la fois, sont capables d'induire un ralentissement, voire même une restauration du système granulocytaire.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le muramyl-peptide présente la formule générale suivante :



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est L-alanyl, L-leucyle, L-isoleucyle, L-valyle, L-thréonyle, L-(N-méthyl)- alanyle et R<sup>7</sup> et R<sup>8</sup> sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, O(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>H avec x = 1, 2, 3, 4 ou 5.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que dans la susdite formule générale:

- R = CH<sub>3</sub>,
- X est L-alanyl ou L-thréonyle,
- R<sub>7</sub> est un groupe O(CH<sub>2</sub>)<sub>x'</sub>H, avec x' = 1, 2, 3 ou 4,
- R<sub>8</sub> est un groupe amino ou un groupe O(CH<sub>2</sub>)<sub>x''</sub>H, avec x'' = 1, 2, 3 ou 4.

6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que le muramyl-peptide est choisi parmi le MDP, le muramétide, le murabutide, le muradimétide ou un homologue de l'un de ces produits se distinguant de celui-ci par la substitution d'un résidu

L-thréonyle au résidu L-alanyle de son groupe peptidique.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le muramyl-peptide est choisi parmi l'un des muramyl-peptides suivants :

- Nac Mur-L-Ala-D isoGln-sn glycéryl dipalmitoyle
- Nac Mur-L-Thr-D isoGln-sn glycéryl dipalmitoyle
- NAc-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-2 (1',2'dipalmitoyl)-sn-glycéro-3'-phosphorylénthylamide (MTP-PE) ;
- N<sub>2</sub> (Nac-Mur-L-Ala-D-isoGln) N<sub>6</sub>-stearoyl-L-Lysine (Muroctasine) ou MDP-Lys (L18) ;
- NAc-glucosaminyl-NAc-Mur-L-Ala-D-isoGln-L-Ala-Glycercyl-dipalmitate (DTP-GDP) ou NAc-glucosaminyl-NAc-Mur-L-Thr-D-iso-Gln-L-Ala-Glycercyl-dipalmitate ;
- Nac-Mur-L-Thr-D-isoGln ;
- Nac-Mur-D-Ala-D-isoGln-1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol
- Nac-Mur-D-Thr-D-isoGln-1,2-dipalmitoyl-sn-glycérol
- Les analogues du MDP dans lesquels le 2<sup>ème</sup> acide aminé, la glutamine est remplacée par une Norleucine, et qui sont dépourvus d'activité pyrogène ;

8. Procédé pour la production d'une composition mettant en oeuvre une cytokine thérapeutiquement utile chez l'homme et pour le traitement des allergies, caractérisée en ce que les principes actifs de cette composition sont constitués par un muramyl-peptide et une cytokine tels qu'ils ont été revendiqués dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la cytokine est un interféron, notamment un interféron  $\alpha$  ou un interféron  $\beta$ .

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la cytokine est un CSF, notamment un GM-CSF.

11. Procédé pour la production d'une composition permettant la mise en oeuvre d'une cytokine thérapeutiquement utile chez l'homme, mais dont les effets secondaires sont tels qu'ils réduisent les possibilités d'administration de cette cytokine seule à l'homme, lorsqu'ils ne les interdisent pas complètement, caractérisé par l'association de cette cytokine avec un muramyl-peptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

12. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la cytokine est une cytokine telle qu'un interféron, notamment un interféron  $\alpha$ , susceptible, en association avec le muramyl-peptide, d'induire une sécrétion in situ, chez le patient traité, de G-CSF et/ou d'IL-6 et/ou d'IL-1 RA.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la composition est destinée au traitement de cancers, de maladies infectieuses ou de déficiences génétiques compensables par la cytokine utilisée.

14. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la composition est destinée à induire soit un ralentissement de la déplétion, soit même une suffisante restauration du système granulocytaire (voire même une réparation de la moelle), que ces affections soient d'un caractère, spontané ou qu'elles résultent d'un traitement cytotoxique, radiothérapique et/ou immunosupresseur.

15. Procédé selon la revendication 13 ou 14, caractérisé en ce que la composition est destinée à un traitement mettant en oeuvre un agent cytotoxique distinct de la cytokine de l'association, concurremment avec le traitement cytotoxique du genre en question, ou chaque fois que le traitement avec l'agent cytotoxique est interrompu aux fins de permettre une restauration

des phagocytes, des plaquettes sanguines et une stimulation de la moelle osseuse.

16. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la composition est destinée à un traitement visant à favoriser une reconstitution plus rapide du système hématopoïétique chez des personnes dont le système immunitaire avait été auparavant inhibé, voire même détruit, notamment pour autoriser une transplantation de moelle osseuse ou plus généralement de tissus ou organes allogènes ou même xénogènes.

17. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisée en ce que la composition est destinée au traitement de maladies virales, qu'il s'agisse d'un traitement dans lequel la cytokine, notamment l'interféron, est directement impliquée en sa capacité anti-virale ou d'un traitement de substitution ou s'intercalant entre des traitements conduits avec d'autres substances antivirales qui doivent être interrompus par intermittences.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la composition est destinée à permettre l'inhibition de la multiplication virale de HIV par l'AZT ou d'autres dérivés de nucléosides ayant une spectre d'action antivirale similaire).

19. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la cytokine est un interféron ou un CSF, notamment un GM-CSF, et en ce que la composition est destinée à la prévention ou au traitement du choc septique dans lequel l'IL-1 joue un rôle primordial, au traitement ou à la prévention de processus inflammatoires, comme dans les cas d'arthrites ou de certaines maladies auto-immunes.

20. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la cytokine est une IL-2, et en

ce que la composition est destinée au traitement de cancers.

21. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la composition est destinée à pallier les effets de médicaments inducteurs ou d'infections inductrices d'une synthèse endogène de IL-1, IL-8 ou TNF.

22. Procédé pour la production d'une composition mettant en oeuvre une cytokine thérapeutiquement utile chez l'homme et plus particulièrement dans des traitements anticancéreux à des doses conférant des effets secondaires importants et notamment à une neutropénie à l'état isolé, caractérisé par l'association de cette cytokine avec le GM-CSF et un muramyl-peptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que la cytokine est un interféron.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que la cytokine est une interleukine, notamment l'IL-2.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 22 à 24, caractérisé en ce que la composition est utilisable pour traiter des infections virales.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 94/00307A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 A61K37/02 // (A61K37/02, 37:66)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 5 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 228 833 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 15 July 1987 see the whole document ---	1-6,11, 13,20
X	EP,A,0 329 609 (CIBA-GEIGY AG) 23 August 1989 see the whole document ---	1-7,9, 11-14,17
X	EP,A,0 257 890 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2 March 1988 see claims; examples 2-5 ---	1-6,9, 11-13,20

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*B\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&amp;\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 1994

Date of mailing of the international search report

- 1. 08. 94

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FR 94/00307

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRITISH JOURNAL OF CANCER vol. 63, no. 3 , 1991 pages 399 - 403 S.T.A. MALIK ET AL 'Therapy of human ovarian cancer xenografts with intraperitoneal liposome encapsulated muramyl-tripeptide phosphoethanolamine (MTP-PE) and recombinant GM-CSF' see the whole document ---	1-7,10
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS vol. 9, no. 1 , February 1990 pages 98 - 102 P.R. WYDE ET AL 'Muramyl peptides and polyinosinic-polycytidylic acid given to mice prior to influenza virus challenge reduces pulmonary disease and mortality' * see the whole document and particularly table 1* ---	1-6,9
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 May 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176682u, SANCEAU J. ET AL 'Secretion of interleukin-6 (IL-6) by human monocytes stimulated by muramyl dipeptide and tumor necrosis factor alpha' page 554 ;column R ; see abstract & IMMUNOLOGY vol. 69, no. 1 , 1990 pages 52 - 56 ---	12
A	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY vol. 319 , 1992 pages 253 - 263 ICHIRO AZUMA ET AL 'Stimulation of host-defense mechanism with synthetic adjuvants and recombinant cytokines against viral infection in mice' see the whole document ---	1-7,10
A	JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH vol. 11, no. SUP1 , November 1991 page S162 P. POUILLART ET AL 'In vitro potentiation by murametide of interferon antiviral activity against encephalomyocarditis infection' * see abstract 3.4 * ----	1-6,9, 11-13
1		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00307

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH vol. 11, no. SUP1 , November 1991 page S257 P. POUILLART ET AL 'Comparison of the therapeutic effect of synthetic muramyl peptides derivatives on the antiviral activity of interferon' * see abstract 8.30 *</p> <p>-----</p>	1-6,9, 11-13

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0228833	15-07-87	AU-B-	601957	27-09-90
		DE-A-	3681145	02-10-91
		JP-A-	62228026	06-10-87
		US-A-	4780313	25-10-88
EP-A-0329609	23-08-89	AU-A-	2894389	17-08-89
		DE-D-	68912155	24-02-94
		DE-T-	68912155	16-06-94
		IL-A-	89248	25-01-94
		JP-A-	2001410	05-01-90
		US-A-	5137720	11-08-92
EP-A-0257890	02-03-88	AU-A-	7652887	18-02-88
		AU-B-	603820	29-11-90
		JP-A-	1079125	24-03-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 94/00307

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 5 A61K37/02 // (A61K37/02, 37:66)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche utilisée

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vistées
X	EP, A, 0 228 833 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 15 Juillet 1987 voir le document en entier ---	1-6, 11, 13, 20
X	EP, A, 0 329 609 (CIBA-GEIGY AG) 23 Août 1989 voir le document en entier ---	1-7, 9, 11-14, 17
X	EP, A, 0 257 890 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) 2 Mars 1988 voir revendications; exemples 2-5 ---	1-6, 9, 11-13, 20

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

'&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Juillet 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 1. 08. 94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Cornec, N

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°  
PCT/FR 94/00307

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BRITISH JOURNAL OF CANCER vol. 63, no. 3 , 1991 pages 399 - 403</p> <p>S.T.A. MALIK ET AL 'Therapy of human ovarian cancer xenografts with intraperitoneal liposome encapsulated muramyl-tripeptide phosphoethanolamine (MTP-PE) and recombinant GM-CSF' voir le document en entier ---</p>	1-7,10
X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL RESPONSE MODIFIERS vol. 9, no. 1 , Février 1990 pages 98 - 102</p> <p>P.R. WYDE ET AL 'Muramyl peptides and polyinosinic-polycytidylic acid given to mice prior to influenza virus challenge reduces pulmonary disease and mortality' * voir le document en entier plus particulièrement table 1 *</p>	1-6,9
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 19, 7 Mai 1990, Columbus, Ohio, US; abstract no. 176682u,</p> <p>SANCEAU J. ET AL 'Secretion of interleukin-6 (IL-6) by human monocytes stimulated by muramyl dipeptide and tumor necrosis factor alpha' page 554 ; colonne R ; voir abrégé &amp; IMMUNOLOGY vol. 69, no. 1 , 1990 pages 52 - 56</p>	12
A	<p>ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY vol. 319 , 1992 pages 253 - 263</p> <p>ICHIRO AZUMA ET AL 'Stimulation of host-defense mechanism with synthetic adjuvants and recombinant cytokines against viral infection in mice' voir le document en entier</p>	1-7,10
A	<p>JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH vol. 11, no. SUP1 , Novembre 1991 page S162</p> <p>P. POUILLART ET AL 'In vitro potentiation by murametide of interferon antiviral activity against encephalomyocarditis infection' * voir abrégé 3.4 *</p>	1-6,9, 11-13
1		-/-

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 94/00307

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH      vol. 11, no. SUP1, Novembre 1991      page S257      P. POUILLART ET AL 'Comparison of the      therapeutic effect of synthetic muramyl      peptides derivatives on the antiviral      activity of interferon'      * voir abrégé 8.30 *</p> <p>-----</p>	1-6, 9, 11-13

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 94/00307

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0228833	15-07-87	AU-B- 601957 DE-A- 3681145 JP-A- 62228026 US-A- 4780313	27-09-90 02-10-91 06-10-87 25-10-88
EP-A-0329609	23-08-89	AU-A- 2894389 DE-D- 68912155 DE-T- 68912155 IL-A- 89248 JP-A- 2001410 US-A- 5137720	17-08-89 24-02-94 16-06-94 25-01-94 05-01-90 11-08-92
EP-A-0257890	02-03-88	AU-A- 7652887 AU-B- 603820 JP-A- 1079125	18-02-88 29-11-90 24-03-89